



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ODONTOLOGIA (PPGO) – MESTRADO



EDUARDO DEON FORTUNATO

Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato

Cascavel-PR  
2018

EDUARDO DEON FORTUNATO

Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Manoela  
Porto Amorim

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de  
Arruda Amorim

Cascavel-PR  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Fortunato, Eduardo Deon

Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato / Eduardo Deon Fortunato; orientador(a), Elaine Manoela Porto Amorim; coorientador(a), João Paulo de Arruda Amorim, 2018.

53 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2018.

1. Triclosan. 2. Desregulador endócrino. 3. Reprodução. 4. Ovário. I. Amorim, Elaine Manoela Porto. II. Amorim, João Paulo de Arruda. III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65  
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110  
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

**EDUARDO DEON FORTUNATO**

Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



\_\_\_\_\_  
Orientador(a) - Elaine Manoela Porto Amorim

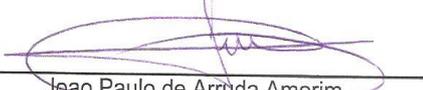
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
\_\_\_\_\_  
Sara Cristina Sagae Schneider

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
\_\_\_\_\_  
Héleno Brandão

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

  
\_\_\_\_\_  
João Paulo de Arruda Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 26 de março de 2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, que me guiou e me protegeu para que eu saísse de casa tão jovem e, assim, ir à busca da realização dos meus sonhos. Aos meus familiares, especialmente meus pais, **Adonis** e **Lucena**, e minha irmã **Fernanda**, que me deram toda a estrutura, amor e carinho para que essa conquista fosse possível. Ao meu companheiro, **Wilson**, pela confiança depositada em mim, que me fortalece todos os dias. Durante todos esses anos, vocês foram para mim um grande exemplo de força, coragem e perseverança para nunca desistir dos meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Profª. Drª. Elaine Manoela Porto Amorim, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim, pela co-orientação, amizade e respeito durante minha trajetória no Mestrado. Saiba que sou imensamente grato por tudo.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Odontologia da Unioeste (Elaine, João Paulo, Ana Lúcia, Mauro, Carlos e Marco Antônio) pelos ensinamentos. Saibam que são um exemplo para mim.

Ao Prof. Dr. Mauro Busatto e Profª. Drª. Sara Cristina Sagae Schneider pelas correções e sugestões realizadas na análise prévia deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia pela oportunidade de realizar o Mestrado nesta instituição a qual tenho grande admiração e respeito.

À UNIOESTE, esta instituição que me acolheu no ano de 2010 como aluno de graduação e em 2016 como aluno da pós-graduação. Hoje, retorno à comunidade extremamente grato pelo aprendizado construído nestes 7 anos de estudos e pela pessoa que me tornei. Espero voltar em breve!

Aos funcionários do Laboratório de Histologia da Unioeste, Vera e Clislaine, pela ajuda, pela paciência e pelos ensinamentos.

*“Oculto na roupagem metafórica palpita a essência real.”*

Helena Kolody

*“A ciência permanecerá sempre à satisfação do desejo mais alto da nossa natureza: a curiosidade; a qual fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte.”*

Ernest Renan

Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato

## RESUMO

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais têm sugerido que os fatores ambientais são uma possível causa para o aumento na incidência de anormalidades reprodutivas e redução da fertilidade, assim como diversos tipos de câncer hormônio-dependente, em ambos os sexos. O triclosan (TCS) é um agente antimicrobiano frequentemente utilizado em produtos industrializados, especialmente de cuidado pessoal e higiene oral. Particularmente na Odontologia, esta substância é amplamente utilizada em dentifrícios e enxaguatórios bucais, obtendo-se excelentes resultados no controle da placa bacteriana e evitando a instalação e progressão de lesões cáries e periodontais. Entretanto, investigações acerca das consequências da extensa utilização do TCS são preocupantes, já que este composto tem sido incluído na lista dos desreguladores endócrinos por seus efeitos adversos observados inicialmente na fauna aquática e, confirmado posteriormente, nas investigações em mamíferos e em humanos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da exposição materna ao TCS, durante a prenhez e a lactação, no desenvolvimento físico, na instalação da puberdade e na morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato. Para tanto, ratas prenhes foram tratadas uma vez ao dia, por via oral, durante a prenhez e a lactação da seguinte forma: Grupo I (GI): composto por 8 ratas do grupo controle que receberam somente óleo de milho nas mesmas condições experimentais dos demais grupos; Grupo II (GII): composto por 8 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 75mg/kg/dia; Grupo III (GIII): composto por 8 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 150mg/kg/dia; Grupo IV (GIV): composto por 8 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300mg/kg/dia. Os filhotes do sexo feminino foram avaliados quanto aos sinais externos do desenvolvimento físico, instalação da puberdade e aos 90 dias foram eutanasiados para pesagem e coleta dos ovários para análise histológica. Os resultados obtidos revelaram que o peso médio da ninhada foi significativamente menor em todos os grupos tratados com TCS, quando comparados aos respectivos controles. Os animais de todos os grupos expostos ao TCS apresentaram atraso no dia da abertura vaginal e do primeiro estro, evidenciando atraso na instalação da puberdade. Além disso, houve redução no número de ciclos estrais, associado à diminuição da frequência da fase de proestro e aumento da frequência da fase de metaestro. A prole feminina das mães tratadas com TCS apresentou menor atividade foliculogênica associada com o aumento da dose de TCS. Conclui-se que a exposição materna ao triclosan, durante a gestação e lactação, causa atraso na instalação da puberdade, desregulação do ciclo estral e redução da atividade foliculogênica na prole feminina de rato.

**Palavras-chave:** Triclosan, desreguladores endócrinos, ovário, rato.

Maternal exposure of triclosan cause fetal development restriction, delay in the onset of puberty, dysregulation of the estrous cycle and reduction of folliculogenesis in rat offspring

## ABSTRACT

Epidemiological, clinical, and experimental studies are suggesting the increase of the incidence of reproductive abnormalities and fertility decline, as well as several hormone-dependent cancers of both sexes. Triclosan (TCS) is an antimicrobial agent used in industrialized products, especially personal care and oral hygiene. Particularly in dentistry, this substance is widely used in dental dentifrices and mouthwashes, obtaining excellent results in control of biofilm and avoiding installation and progression of carious and periodontal lesions. Several studies are concern about TCS as lately this compound has been included in the list of endocrine disrupters because of their adverse effects initially observed in aquatic fauna and confirmed in mammalian and human investigations. So, the objective of the present study was to evaluate the effects of maternal exposure to TCS, during pregnancy and lactation, on physical development, on puberty and on ovarian morphology of female offspring. For this purpose, pregnant rats were treated once a day orally during pregnancy and lactation as follows: Group I (GI): composed of 8 rats from the control group that received only corn oil under the same experimental conditions other groups; Group II (GII): composed of 8 rats that received TCS diluted in corn oil at a dose of 75mg / kg / day; Group III (GIII): composed of 8 rats that received TCS diluted in corn oil at a dose of 150mg / kg / day; Group IV (GIV): composed of 8 rats that received TCS diluted in corn oil at a dose of 300mg / kg / day. The female offspring were evaluated for external signs of physical development, puberty and at 90 days were euthanized for weighing and collection of ovaries for histological analysis. The results showed that the animal body weight was significantly lower in all TCS treated groups. Animals from all groups exposed to TCS were delayed on the day of vaginal opening and on the first estrus, showing delay in the onset of puberty. In addition, there was a reduction in the number of estrous cycles, associated with decrease in the frequency of the proestrus phase and increase in the methaestrus phase. The female offspring of TCS treated mothers had lower folliculogenic activity associated with increased TCS dose. It is concluded that maternal exposure to triclosan, during gestation and lactation, causes delayed puberty, dysregulation of the estrous cycle and reduction of folliculogenic activity in the female offspring of the rat.

**Key words:** Triclosan, endocrine disrupters, ovary, rat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Semelhança estrutural entre o triclosan, bisfenol-A, dietilestilbestrol e a tiroxina ..... 17
- Figura 2:** Ligação de um desregulador endócrino a um receptor de estrógeno na membrana nuclear ou a ligação de um DE ao receptor acoplado de proteína G na membrana citoplasmática pode interferir na transcrição de genes dentro do núcleo celular. Esta interação pode resultar em resposta celular sem regulação, podendo produzir respostas nocivas nos órgãos e tecidos alvo ..... 18
- Figura 3:** Fotografia microscópica do folículo de Graaf ..... 20
- Figura 4:** Desreguladores endócrinos afetam a foliculogênese. As mulheres nascem com um número limitado de folículos primordiais imaturos que, ao longo do tempo, crescem e amadurecem para que ocorra a ovulação. Folículos primordiais afetados por DEs podem levar a infertilidade precoce, infertilidade permanente e alteração nos níveis hormonais ..... 22
- Figura 5:** Esteroidogênese é o processo de produção dos hormônios sexuais. Este processo necessita da participação de células da teca e da granulosa do folículo antral. Diferentes enzimas presentes nestas células são responsáveis pelo metabolismo do colesterol em estrogênio e outros hormônios sexuais. Os DEs podem alterar a expressão, as concentrações protéicas e a atividade destas enzimas resultando em alterações das concentrações de secreção dos hormônios sexuais ..... 24

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** – Adenosina-difosfato
- AR** - Receptor de andrógeno
- DDE** - Diclorodifeniletano
- DDT** - Dicloro-difenil-tricloroetano
- DE** – Desregulador endócrino
- DG** – Dia gestacional
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DPN** – Dia pós-natal
- E2** - 17 $\beta$ -estradiol
- EE** – Etinilestradiol
- ER** - Receptores de estrógeno
- ER $\alpha$**  – Receptor de estrógeno alfa
- ER $\beta$**  – Receptor de estrógeno beta
- FSH** – Hormônio folículo estimulante
- GnIH** – Hormônio inibidor de gonodotrofina
- GnRH** – Hormônio liberador de gonodotrofina
- HCG** – Gonadotrofina coriônica humana
- HE** – Hematoxilina-eosina
- IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- KDa** – Quilodaltos
- LD** – Dose letal
- LH** – Hormônio luteinizante
- n** – Número de indivíduos da ninhada
- NaCl** – Cloreto de sódio
- NHANES** - *The National Health and Nutrition Examination Survey*
- PBDEs** - Difenil-éteres-polibromados
- PCBs** – Bifenilpoliclorados
- PR** - Receptor de progesterona
- PRA** – Receptor de progesterona A
- PRB** – Receptor de progesterona B
- RNA** – Ácido Ribonucléico

**T<sub>3</sub>** - Triiodotironina

**T<sub>4</sub>** - Tiroxina

**TCDD** - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

**TCS** – Triclosan

**TR** - Receptores de tiroxina

**TSH** – Hormônio tireoestimulante

**USPTO** - *United States Patent and Trademark Office*

Dissertação elaborada e formatada conforme  
as normas das publicações científicas:

*Reproductive Toxicology*

Disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/reproductive-toxicology/0890-6238/guide-for-authors>

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	13
3.1 Triclosan .....	13
3.2 Desreguladores Endócrinos e Triclosan .....	14
3.3 Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino .....	19
3.4 Desreguladores endócrinos e o sistema reprodutor feminino .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
ARTIGO .....	31
ANEXO 1 .....	53

## INTRODUÇÃO GERAL

### Triclosan

A substância química 5-cloro-2-(2,-diclorofenoxi) fenol (nome oficial pela IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), usualmente conhecida como triclosan, possui fórmula molecular  $C_{12}H_7Cl_3O_2$ , peso molecular 289,53 KDa, ponto de fusão entre 54-57°C e ponto de ebulição entre 280-290°C; sendo em seu estado puro encontrado comercialmente como um pó cristalino e esbranquiçado de odor característico (DANN & HONTELA, 2011). O TCS é um composto sintético desenvolvido pela indústria há mais de 40 anos encontrado comercialmente como Irgasan<sup>®</sup>, Ster-Zac<sup>®</sup>, Cloxifenolum<sup>®</sup>, Lexol 300<sup>®</sup>, Tinosan AM110 Antimicrobial<sup>®</sup>, Invasan DP300<sup>®</sup>, Aquaset<sup>®</sup>, Gamophen<sup>®</sup>, entre outros (ADOLFSON-ERICI *et al.*, 2002).

O triclosan é um agente químico bifenólico (com dois anéis aromáticos) de amplo espectro de atividade sobre bactérias Gram-positivas e, maior parte das Gram-negativas. A capacidade antimicrobiana da substância despertou interesse da indústria a partir de 1972, a qual passou a usar o TCS na manufatura de dentifrícios, enxaguatórios bucais, sabonetes, desodorantes, cremes, xampus, entre outros produtos de cuidados corporais e higiene pessoal. É utilizado, ainda, como princípio ativo de diversos produtos industrializados, veterinários e de limpeza geral, dentre os quais se destacam os detergentes, plásticos, brinquedos, palmilhas de calçados, produtos têxteis e artigos que entram em contato com alimentos (FANG *et al.*, 2010; CULLINAN *et al.*, 2012). Segundo a *United States Patent and Trademark Office* (USPTO – [www.uspto.gov](http://www.uspto.gov)) até o ano de 2008, 2.385 patentes continham a palavra “Triclosan” em suas formulações. A segurança do seu uso é avaliada e aprovada pelas agências regulatórias de cada país, como ocorre em países da Grã-Bretanha e União Europeia, no Canadá, nos Estados Unidos e em outros países ao redor do globo (DAYAN, 2007).

O extenso uso do triclosan pode ser verificado através dos grandiosos números que envolvem sua produção e sua aplicação. Acredita-se que sejam produzidas mais de 1.500 toneladas de TCS por ano em todo mundo, sendo os Estados Unidos e Europa os principais produtores e consumidores deste composto. Na União Europeia (UE), cerca de 85% do volume total de triclosan é utilizado em produtos de higiene pessoal (dentifrícios, sabonetes, xampus e cosméticos), 5% é usado para aplicação na indústria têxtil (tecidos antialérgicos) e 10% em plásticos e materiais que entram em contato com alimentos (AXELTAD *et al.*, 2013; KOEPPE *et al.*, 2013). Como consequência, o TCS tem sido encontrado como contaminante

ambiental pela sua bioacumulação na biota; presente nos mananciais de água após o tratamento, em rios, lagos, mares, águas residuais e sedimentos, bem como na bile de peixes selvagens, confirmando a extensa contaminação dos mananciais e da fauna aquática (TATARAZAKO *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2010).

Segundo a agência regulatória americana *The National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), o contato com produtos que contenham triclosan está diretamente ligado com a idade, bem como com a classe econômica do indivíduo; ao passo em que há o aumento da idade e do poderio econômico do cidadão, maior seu contato com a substância. Este dado leva a crer que a exposição contínua ao TCS poderia acarretar no seu acúmulo e na detecção em diferentes fluídos e partes do corpo humano (HONKISZ *et al.*, 2012).

A extensa exposição humana ao triclosan é evidenciada através das amostras de fluídos corporais contaminadas pelo composto. Diferentes trabalhos têm encontrado e quantificado a presença de TCS em amostras de urina (CALAFAT *et al.*, 2008; KOEPPE *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2015; WEISS *et al.*, 2015; BUCKLEY *et al.*, 2016), amostras de leite materno (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002; ALLMYR *et al.*, 2006; DAYAN, 2007), amostras de plasma sanguíneo (ALLMYR *et al.*, 2006; SHEKHAR *et al.*, 2016) e amostras de líquido amniótico (SHEKHAR *et al.*, 2016). O TCS é um composto lipofílico, solúvel em gordura, sofrendo bioacumulação no tecido adiposo (GEENS *et al.*, 2015). A exposição ao TCS ocorre através da ingestão da substância, inalação ou ainda pelo contato dermatológico (FANG *et al.*, 2010), sendo a água contaminada e os produtos cosméticos e de higiene os principais responsáveis pela interação indivíduo-substância (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002; ALLMYR *et al.*, 2006). A absorção ocorre através do trato gastrointestinal quando o composto é ingerido, contato com a mucosa oral ou ainda, através da pele após o contato dermatológico. Em seguida da absorção, a maior fração do TCS é excretada na urina; no entanto, a excreção urinária total do TCS varia entre os indivíduos, com 24% a 83% da dose sendo eliminada durante os primeiros 4 dias após a exposição (FANG *et al.*, 2010; DANN & HONTELA, 2011).

### **Desreguladores endócrinos e o Triclosan**

Numerosos efeitos indesejáveis são descritos em consequência do uso do triclosan, em estudos envolvendo modelos em ratos e em humanos, que incluem dermatite, irritação da pele, reações de imunotoxicidade e neurotoxicidade (GLASER, 2004; SAVAGE *et al.*, 2012). A comunidade científica vem sugerindo o TCS como uma substância potencial entre os

desreguladores endócrinos por seus efeitos observados inicialmente na fauna aquática (ORVOS *et al.*, 2002; TATARAZAKO *et al.*, 2004; CAPDEVIELLE *et al.*, 2008). Por definição, desregulador endócrino é “qualquer agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais”, resultando assim em um desvio do controle homeostático normal do organismo (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

O sistema endócrino é representado por um conjunto de órgãos que apresentam como atividade característica a produção e secreção de hormônios, substâncias químicas que são lançadas na corrente sanguínea e que irão atuar em órgãos ou tecidos-alvo específicos do organismo, controlando ou auxiliando o controle de sua função. O sistema endócrino influencia todos os aspectos da saúde e bem-estar do organismo animal, incluindo desenvolvimento, crescimento, funções reprodutivas, cognitivas, metabólicas e aspectos comportamentais (ROMJIN, 1999). Assim, o fenômeno da desregulação endócrina é um assunto de grande interesse nos meios científicos e de extrema importância em saúde pública, animal e ambiental, que deve ser cuidadosa e extensivamente investigada e debatida pela comunidade científica e pelo público em geral.

O contato com substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas pode acontecer em qualquer fase da vida de um animal. A exposição poderia acarretar em diversas anormalidades estruturais e funcionais durante o desenvolvimento do organismo, bem como doenças no adulto (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; COSTER & LAREBEKE, 2012). Por isso, a desregulação endócrina causada por substâncias exógenas não afetaria apenas o organismo exposto, poderia afetar seus descendentes através de modificações epigenéticas do genoma, extrínsecas ou intrínsecas a linhagem de células germinativas (CHIAM *et al.*, 2009).

Estudos vêm mostrando que os DEs podem ser responsáveis por alterações epigenéticas nos indivíduos, alterando a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA. As mudanças acontecem através da metilação das bases de DNA, modificações pós-tradução das proteínas histonas ou ainda a não codificação de RNA mensageiro (UZUMCU *et al.*, 2012). Defeitos epigenéticos podem ocorrer durante dois estágios diferentes de desenvolvimento do embrião: durante sua pré-implantação no útero ou nas células germinativas primordiais (que podem se tornar os futuros óvulos ou espermatozoides). Se as alterações ocorrerem durante a pré-implantação do embrião, os três folhetos germinativos serão afetados e, conseqüentemente, todos os tecidos do novo organismo apresentarão alterações (DOLINOY *et al.*, 2007). No entanto, se as reprogramações epigenéticas ocorrerem nas células

germinativas da prole, observaremos futuras gerações afetadas (STOUDER & PAOLONI-GIACOBINO, 2011).

O fenômeno da desregulação endócrina não é novo em si. No ano de 1930 o naturalista Charles Broley descreveu os primeiros registros da literatura referindo-se a observações de declínio populacional, anormalidades reprodutivas e comportamentais de pássaros nos Estados Unidos e no Canadá. Logo, Beans em 1936 associou estas anormalidades observadas nos pássaros com a exposição de peixes ao pesticida DDT (diclorodifenil-tricloroetano). Seguindo a mesma teoria, Rachel Carsen em 1962, descreveu observações similares dos efeitos da desregulação endócrina em pássaros em seu famoso livro “*Silent Spring*”, responsável pela maior revolução ecológica dos Estados Unidos e do mundo na época do lançamento (EPSTEIN, 2014). Estas observações iniciais do fenômeno da desregulação endócrina foram confirmadas, posteriormente, em diversos trabalhos com animais vertebrados e humanos (VELDHOEN *et al.*, 2006; CROFTON *et al.*, 2007; JUNG *et al.*, 2012; PAUL *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015).

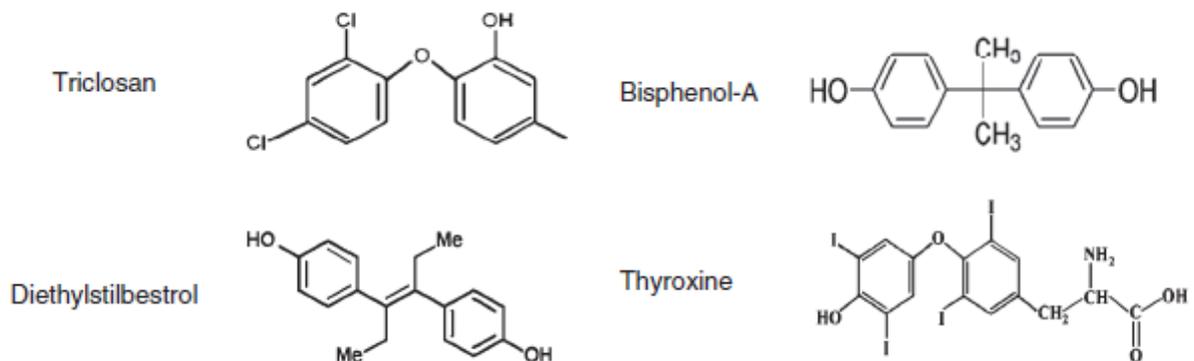
Dados epidemiológicos revelam que nos últimos 50 anos observa-se um crescimento no número de casos de doenças em que os desreguladores endócrinos poderiam estar envolvidos: neoplasias de mama, testículo e próstata; diabetes; obesidade e diminuição da fertilidade; no entanto, o aumento de casos destas patologias poderia estar envolvido, aparentemente, com o maior acesso aos meios diagnósticos a partir da revolução tecnológica e científica na saúde global ocorrida nos últimos anos (COSTER & LAREBEKE, 2012). A grande dificuldade em se estudar os efeitos da desregulação endócrina nos animais e nos seres humanos decorre do fato de que os riscos são muitas vezes específicos da espécie e dependem de uma série de variáveis. Destacam-se aí a latência entre exposição e o efeito observado, o tempo e a natureza da exposição, a dose, a idade, o sexo, a susceptibilidade individual de cada organismo, dentre outros fatores (PATIASUL & ADEWLE, 2009).

Uma gama de substâncias químicas de origem natural (metais, tais como cádmio e chumbo), sintética ou antropogênicas (poluentes ambientais), já foram caracterizadas e classificadas como desreguladores endócrinos devido aos seus efeitos adversos sobre o sistema endócrino. Incluem-se nesta lista os agentes fenólicos como parabenos (encontrados nas formulações cosméticas), cetonas aromáticas (formulação de protetores solares), 2,5-diclorofenol (usado na fabricação de desodorantes, desinfetantes e pesticidas), fenóis alquila (agentes espumantes utilizados na construção civil), bifenóis-policlorados (PCB's – solventes e lubrificantes industriais), diclorodifeniltricloroetano (encontrado em pesticidas), bisfenol-A (plásticos para embalagem de alimentos) e o triclosan (encontrado em formulações

antibacterianas) (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; BUCKLEY *et al.*, 2016; SHEKHAR *et al.*, 2016). Ademais, outras centenas de compostos ainda necessitam de investigação (PATIASUL & ADEWLE, 2009).

A principal evidência que suporta o TCS como um desregulador endócrino é sua molécula, a qual é constituída por dois anéis aromáticos (fenólicos ou benzênicos), semelhante às estruturas químicas de outros compostos comprovadamente DEs do sistema reprodutor, como (bisfenol-A (BPA), dioxinas e bifenilopoliclorado (PCB's) (WANG & TIAN, 2015). Além disso, desde a última década, trabalhos vêm demonstrando seu efeito potencial sobre organismos aquáticos (ORVOS *et al.*, 2002; TATARAZAKO *et al.*, 2004). Um dos primeiros relatos consta no trabalho desenvolvido por Foran *et al.* (2000), que verificaram a exposição de peixes (espécie *Oryzias latipes*) ao triclosan, por um período de 14 dias, iniciando dois dias após a eclosão dos ovos. A contaminação com a substância foi associada a um aumento no tamanho das nadadeiras além de diminuição da atividade androgênica. Por outro lado, Ishibashi *et al.* (2004), demonstraram que esta mesma espécie de peixe, quando exposta ao TCS, durante as fases iniciais de desenvolvimento, foi caracterizada pela atividade estrogênica capaz de induzir vitelogênese nos machos.

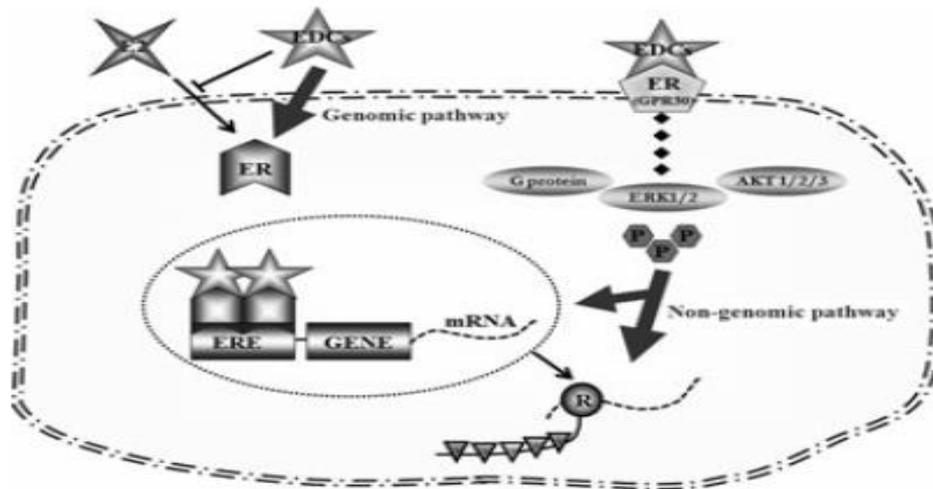
A estrutura molecular do TCS (Figura 1) é semelhante a outros desreguladores endócrinos conhecidos, tais como o bifenilopoliclorado (PCBs), difenil-éteres-polibromados (PBDEs), bisphenol-A, dioxinas e também com o hormônio tireoidiano (ALLMYR *et al.*, 2009; DANN & HONTELA, 2011), todas estas moléculas com estrutura química possuindo dois anéis aromáticos.



**Figura 1.** Semelhança estrutural entre o triclosan, bisfenol-A, dietilstilbestrol e a tiroxina. (Adaptado de DANN & HONTELA, 2011).

O mecanismo de ação dos DE não está completamente esclarecido. Acredita-se que essas moléculas atuem em receptores hormonais presentes no núcleo celular, receptores de

hormônios esteroides na membrana citoplasmática, receptores de neurotransmissores (como os receptores de serotonina, dopamina e noradrenalina), receptores órfãos (receptores de hidrocarbonetos aromáticos), receptores de estrogênio (ER), receptores de andrógenos (AR), receptores de progesterona (PR), receptores de tiroxina (TR) e nos receptores retinóicos (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Ligação de um desregulador endócrino a um receptor de estrogênio na membrana nuclear ou a ligação de um DE ao receptor acoplado de proteína G na membrana citoplasmática pode interferir na transcrição de genes dentro do núcleo celular. Esta interação pode resultar em resposta celular sem regulação, podendo produzir respostas nocivas nos órgãos e tecidos alvo (Adaptado de Lee *et al.*, 2013).

Em se tratando da exposição humana a um agente desregulador endócrino, um exemplo clássico na literatura é o dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético, não esteroidal, desenvolvido no ano de 1938, prescrito para mulheres grávidas a fim de evitarem-se abortos espontâneos (PALMLUND, 1996). Posteriormente, nas décadas de 70 e 80, verificou-se que as filhas de mulheres que foram tratadas com DES durante a gestação, apresentavam grande incidência de câncer vaginal e do colo do útero, reduzida fertilidade e grande risco de infertilidade, além de complicações gestacionais (PALMLUND *et al.*, 1993; PALMLUND, 1996).

Estudos atuais sugerem que a exposição aos DEs, nas fases iniciais da vida, parece interferir na adipogênese e no equilíbrio energético dos indivíduos, acarretando em risco maior de obesidade. Buckley *et al.* (2016) avaliaram a ação da exposição de agentes DEs durante a gestação em crianças com idade entre 4-9 anos. Amostras de urina foram coletadas

das mães durante o terceiro trimestre de gestação e as crianças avaliadas através de escala para medição da massa gorda. Neste estudo, TCS e BPA não foram associados com aumento da massa de gordura, no entanto, a exposição intrauterina a benzofenona (cetona aromática) foi relacionada com aumento do tecido adiposo em crianças do sexo feminino.

Para tentar elucidar o mecanismo de ação do TCS em mamíferos, Kumar *et al.* (2009) trataram ratos adultos por um período de 10 semanas, com três diferentes doses do composto. Os resultados deste trabalho claramente apontaram para a ação anti-androgênica do triclosan, demonstrada por sua capacidade em diminuir síntese de andrógenos, por causar danos histopatológicos nos testículos e glândulas sexuais acessórias, reduzir a produção diária de espermatozoides, e perturbar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

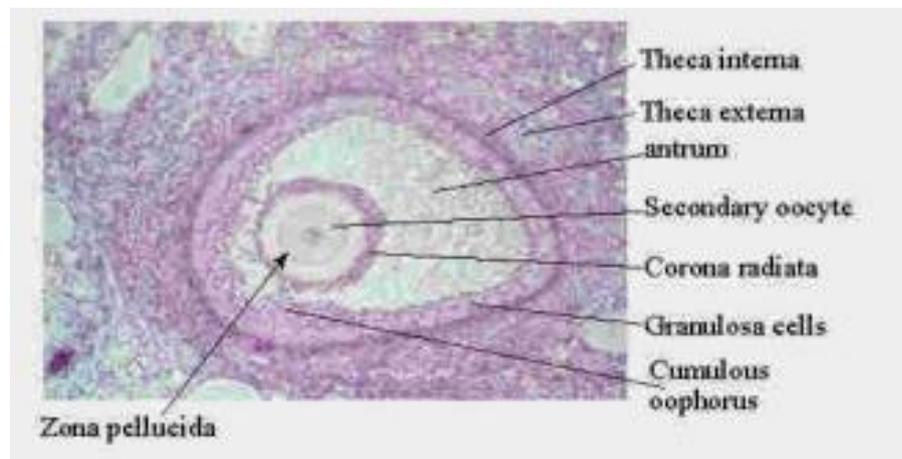
Para verificar a influência do TCS sobre o sistema endócrino, Paul *et al.* (2009) e Paul *et al.* (2012) testaram a hipótese em que o antimicrobiano triclosan diminuiria as concentrações de tiroxina (T<sub>4</sub>) circulante através de modificações na sinalização e transporte de células hepáticas. Ratas fêmeas, recém desmamadas, receberam o composto (0-1000mg/kg/dia) durante 4 dias através de sonda gástrica; foram eutanasiadas e amostras de sangue e dos tecidos hepáticos foram coletados para análise. Os níveis de T<sub>4</sub>, triiodotironina (T<sub>3</sub>) e hormônio tireoestimulante (TSH) foram verificados, bem como a atividade microsomal hepática, atividade enzimática, RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) e citocromos. Houve uma diminuição dos níveis em mais de 40% de T<sub>4</sub> e 75% de T<sub>3</sub> se comparados com grupo controle. Os níveis de atividade microsomais, enzimáticas e de citocromos de células hepáticas aumentaram drasticamente. O estudo concluiu que o hipotireoidismo em ratos poderia estar envolvido com *up-regulation* do catabolismo hepático, induzindo a uma ativação enzimática em células do fígado (PAUL *et al.*, 2009).

### **Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino**

O sistema reprodutor dos mamíferos é responsável por produzir e transportar os gametas para a reprodução sexual e; nas fêmeas, atua também protegendo e nutrindo o embrião em desenvolvimento (WALKER & HOMBERGER, 1997). Nas ratas, o sistema reprodutor é formado basicamente pela vagina, útero, ovários e tubas uterinas (ANDERSEN *et al.*, 2004). Nesses animais o útero é um órgão em forma de Y, formado por um par de cornos uterinos, independentes entre si. Caudalmente, esses cornos são rodeados por musculatura, formando um pequeno corpo uterino e logo, inferiormente, encontra-se a cérvix uterina (WALKER & HOMBERGER, 1997).

Os ovários constituem-se de uma massa sólida de células e tecidos. Podem ser divididos em córtex, medula e hilo. O córtex constitui a maior parte do ovário, delimitado externamente pelo epitélio germinativo, contendo o estroma e os folículos; a medula compreende um agregado celular heterogêneo; e o hilo por onde entram e saem os vasos sanguíneos que irrigam o órgão. O tecido conjuntivo cortical forma uma camada densa em volta do ovário, que é desprovido de folículos, recebendo o nome de túnica albugínea. A periferia do córtex ovariano, profundamente a túnica albugínea, é composta por várias camadas de folículos primordiais. Cada um desses folículos contém um oócito primário e é circundado por uma camada de células achatadas (JUNQUEIRA, 1999).

A formação de folículos inicia-se, no ovário fetal, entre a 12<sup>a</sup> e a 16<sup>a</sup> semana de gestação. Quando o ovócito entra em meiose, é rodeado por uma camada de células fusiformes provenientes do estroma ovariano, constituindo-se o folículo primordial. Entre a 20<sup>a</sup> e a 30<sup>a</sup> semana, estas células fusiformes transformam-se em células cubóides (já chamadas células da granulosa) e o folículo passa a se chamar folículo primário. Então, as células da granulosa passam a dividir-se e constituir diversas camadas, criando-se o folículo secundário e, sucessivamente, os folículos em amadurecimento, secretando mucopolissacarídeos que constituem um halo protetor do ovócito, conhecido como zona pelúcida (JUNQUEIRA, 1999).



**Figura 3.** Fotografia microscópica do folículo de Graaf (Adaptado de Craig & Wang & Flaws, 2011).

Cinco a sete dias após o primeiro dia de uma menstruação é selecionado um folículo maduro, que se torna o folículo dominante do presente ciclo. Os folículos restantes, ou secundários, sofrem atresia, processo o qual é estimulado por hormônios andrógenos e inibido pelas gonadotrofinas. O folículo dominante cresce exponencialmente nas 48 horas anteriores à ovulação, atingindo os 20mm de diâmetro e fazendo saliência macroscópica à superfície do

ovário. A camada basal de células da granulosa é degradada proteoliticamente e liberta-se um ovócito secundário, rodeado pela zona pelúcida e pela *corona radiata*. Se não for fecundado, degenera em 12 a 24 horas. No entanto, se houver fecundação, o ovócito completa a segunda divisão meiótica, em que o citoplasma é, novamente, dividido de modo desigual: a maior parte permanece no zigoto (ovo fertilizado) e o restante vai para o segundo corpo polar que acaba por degenerar (CRAIG & WANG & FLAWS, 2011).

Como o ovário funciona também como um órgão endócrino, produz hormônios responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento dos folículos. Após a ovulação, há formação do corpo lúteo a partir das células remanescentes do folículo maduro rompido durante a ovulação. Os folículos, juntamente com o corpo lúteo, são glândulas endócrinas, os quais desenvolvem-se sob estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), secretado pela adenohipófise. A secreção de FSH e LH é estimulada no hipotálamo pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); hormônio que provoca uma liberação muito maior de LH do que de FSH, por isso é conhecido também como LHRH. Antes da puberdade, a secreção de GnRH é contínua e não consegue despertar a secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Entretanto, na puberdade, por maturação do sistema límbico, a secreção de GnRH torna-se pulsátil, restringindo-se, primeiro, à fase REM do sono e generalizando-se, depois, ao sono não-REM e finalmente às 24 horas (CRAIG & WANG & FLAWS, 2011).

Então, assim que os folículos se tornam maduros, secretam o estrógeno, responsável pelo crescimento uterino e desenvolvimento endometrial. O corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona, desenvolve-se por influência do hormônio luteinizante (LH), também secretado pela adenohipófise. A progesterona é fundamental para o desenvolvimento final e aumento da vascularização do endométrio, preparando-o para uma possível implantação do óvulo fertilizado. Também está envolvido na manutenção do endométrio proliferado e da placenta nos primeiros estágios de prenhez (WALKER & HOMBERGER, 1997).

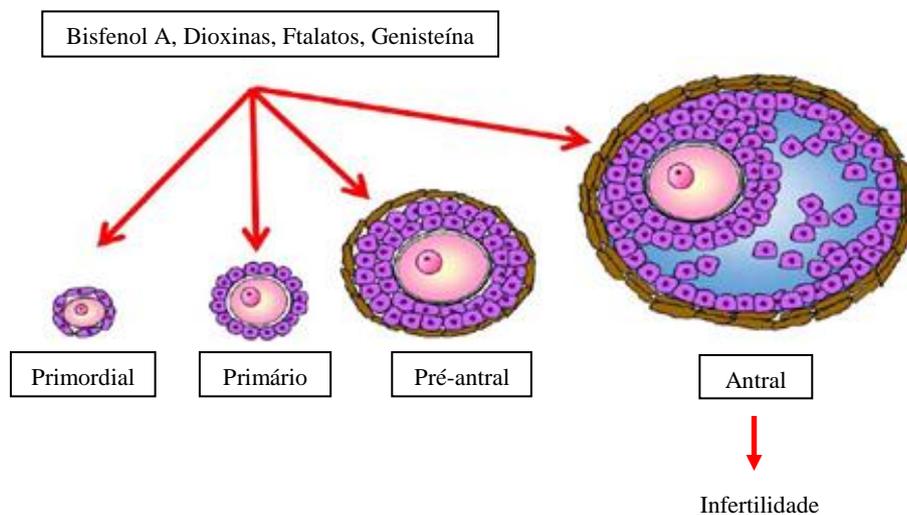
Majoritariamente as gonadotrofinas LH e FSH são consideradas os principais reguladores dos processos de diferenciação e proliferação folicular. Entretanto, a literatura atual tem apresentado uma mudança na dinâmica de atuação dos hormônios nos diferentes processos envolvidos com a fertilidade do sexo feminino e uma série de substâncias secretadas pelo ovário, entre elas o 17 $\beta$ -estradiol (E2), progesterona (PR), polipeptídeos como inibina, activina e folicatina, fatores de crescimento como fator de crescimento da insulina I (IGF I), fator de crescimento epidérmico, hormônio antimülleriano, fator de crescimento de

fibroblastos e fatores angiogênicos parecem estar relacionados nestes processos (CRAIG *et al.*, 2011).

Diferentemente da condição humana, as ratas são poliétricas; com ciclos reprodutivos que possuem média de duração entre quatro e cinco dias, com quatro a doze oócitos sendo liberados por cada novo ciclo (WALKER & HOMBERGER, 1997).

### Desreguladores endócrinos e o sistema reprodutor feminino

Diferentes agências de fiscalização e controle de diversos países vêm mostrando preocupação com a contaminação da população e do meio ambiente com as substâncias DEs. Diariamente a população é exposta a diferentes compostos que são responsáveis por alterações homeostáticas da saúde reprodutiva do homem e da mulher, provocando infertilidade, insuficiência ovariana prematura e a alteração nos níveis de hormônios sexuais. A infertilidade, por exemplo, é um problema de saúde pública afetando milhões de homens e mulheres ao redor do mundo, diminuindo a qualidade de vida; resultando em um aumento de gastos na busca de tratamentos médicos apropriados (PATEL *et al.*, 2015).



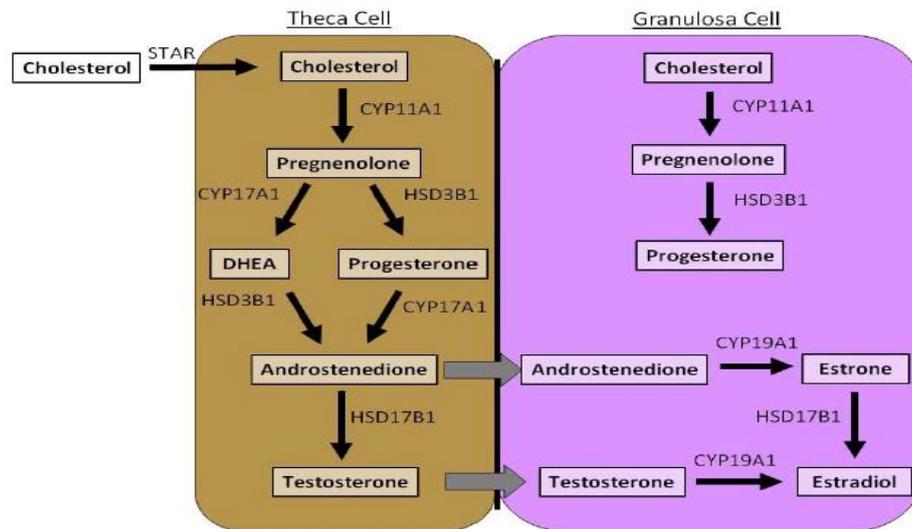
**Figura 4.** Desreguladores endócrinos afetam a foliculogênese. As mulheres nascem com um número limitado de folículos primordiais imaturos que, ao longo do tempo, crescem e amadurecem para que ocorra a ovulação. Folículos primordiais afetados por DEs podem levar a infertilidade precoce, infertilidade permanente e alteração nas concentrações hormonais (Adaptado de Patel *et al.*, 2015).

Alguns desreguladores endócrinos parecem exercer atividade hormonal, alterando a homeostase e a regulação das funções do sistema reprodutor feminino. Entre os anos de 1997-1999, nos Estados Unidos, 50 mulheres imigrantes do sudoeste asiático em idade reprodutiva

tiveram sua urina coletada diariamente para análise de metabólitos de estrogênio e progesterona; foram realizadas coletas de sangue para quantificação de compostos orgânicos clorados (DDT, seu metabólito diclorodifeniletano - DDE e PCB's); bem como, acompanhadas para verificação dos ciclos menstruais. Todas as amostras de sangue das mulheres continham DDE, nas quais se verificou um encurtamento de até 4 dias nos ciclos menstruais (concentrações mais altas de DDE) com média de encurtamento de 1 dia. A fase lútea diminuiu, em média, 1,5 dias, em que verificou-se que com o aumento das concentrações de DDE ouve uma diminuição nas concentrações de metabólitos de progesterona. O estudo sugere um potencial efeito do desregulador endócrino DDE na função ovariana, influenciando a fertilidade, gravidez e aumento do risco de câncer (WINDHAM *et al.*, 2005).

Outro DE que parece exercer efeitos deletérios sobre o tecido ovariano é 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um composto organoclorado encontrado em pesticidas e como produto de combustão em incêndios. O TCDD ficou famoso após o acidente ocorrido na cidade de Seveso, na Itália, em 1976, quando matou mais de 3.000 animais e, necessitou o abate e outros 7.000, ao ser lançado no ar após a explosão de uma indústria (JABLONSKA *et al.*, 2010). Segundo os autores, a toxicidade desta substância é mediada exclusivamente pelo receptor de Aril hidrocarboneto (AhR) e o papel desta via de ativação sobre o sistema reprodutor feminino, em condições normais, ainda não é completamente esclarecido. O estudo revelou sensibilidade a TCDD do ovário em desenvolvimento, atraso no início da puberdade, bem como a perda da função reprodutiva precocemente na idade adulta.

O trabalho de Honkisz *et al.* (2012) avaliou a influência do TCS sobre a secreção de progesterona, estradiol e gonadotrofina coriônica humana (HCG) em cultura de células; bem como a viabilidade e proliferação celular, além de efeito apoptótico da exposição ao TCS. Os resultados obtidos evidenciaram grande efeito citotóxico, anti-proliferativo e apoptótico do triclosan em maiores concentrações, aumento da secreção de estradiol e progesterona e efeitos adversos na secreção de HCG. Os autores concluíram que o TCS pode afetar o crescimento da placenta e, por consequência do feto, já que contribuiu indiretamente na alteração da síntese de hormônios esteroides.



**Figura 5.** Esteroidogênese é o processo de produção dos hormônios sexuais. Este processo necessita da participação de células da teca e da granulosa do folículo antral. Diferentes enzimas presentes nestas células são responsáveis pelo metabolismo do colesterol em estrogênio e outros hormônios sexuais. Os DEs podem alterar a expressão, as concentrações protéicas e a atividade destas enzimas resultando em alterações das concentrações de secreção dos hormônios sexuais (Adaptado de Patel *et al.*, 2015).

Com relação ao triclosan, Louis *et al.* (2013) relatam o efeito potencializador do composto sobre o anticoncepcional etinilestradiol (EE), uma substância derivada do 17 $\beta$ -estradiol (E2), o principal estrogênio endógeno nos seres humanos. Seu experimento não obteve resultados significativos quando o TCS foi administrado unicamente; entretanto demonstrou um crescimento atípico das células uterinas do rato na administração concomitante de TCS e EE, bem como aumento do peso das células epiteliais e mudança na expressão de genes de estrógeno. O estudo contemplou apenas os efeitos sobre as células uterinas, não envolvendo efeitos sobre o tecido ovariano.

Wang *et al.* (2015) relatam em seu trabalho a influência do TCS no aumento do número de casos de aborto em um modelo em ratos e em humanos. O estudo revela que a concentração urinária de TCS em 28,3% das amostras de mulheres que tiveram aborto precocemente foi 11,3 vezes maior em comparação com gestações normais. A morte fetal foi dose-dependente, a qual se verificou através da formação de trombos placentários, aumento da agregação plaquetária e necrose tecidual, ao passo que a prole viva teve diminuição do peso ao nascimento proporcionalmente ao aumento da exposição ao TCS. As concentrações séricas de estrogênio e da proteína estrogênio sulfotransferase (responsável pela sulfonação de estrogênio durante a gestação) não foram alterados, no entanto verificou-se uma redução

drástica na conjugação entre as duas moléculas. Os autores concluíram que a exposição ao triclosan causaria o aborto através da inibição da conjugação entre estrogênio e estrogênio sulfotransferase, que por sua vez atua inibindo a trombose placentária.

Embora as informações disponíveis atualmente sejam contraditórias e incompletas, os trabalhos experimentais suportam a teoria de que o TCS é um DE do sistema reprodutor feminino. Fatores como a perturbação do metabolismo hormonal, deslocamento de hormônios a partir dos receptores hormonais e a interrupção da ação de enzimas relacionadas com a síntese de estrogênio tem contribuído para afirmar a ação desreguladora do TCS na homeostase do sistema reprodutor feminino (WANG & TIAN, 2015).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFSSON-ERICI, M.; PETTERSON, M.; PARKKONEN, J. *et al.* Triclosan, a commonly used bactericide found in human breast milk and in the aquatic environment in Sweden. **Chemosphere**, New York, v.46, n.9-10, p.1485-9, Mar. 2002.

ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M. S. *et al.* Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v.372, n.1, p.87-93, Dec. 2006.

ALLMYR, M.; PANAGIOTIDIS, G., SPARVE, E. *et al.* Human exposure to triclosan via toothpaste does not change CYP3A4 activity or plasma concentrations of thyroid hormones. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Compenhagen, v.105, n.5, p. 339/44. Jul. 2009.

ANDERSEN, M. L.; ALMEIDA, V.D.; KO, G.M. *et al.* Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação. 1ª ed. São Paulo: UNIFESP- Escola Paulista de Medicina, 2004.

AXELTAD, M.; BOBERG, J.; VINGGAARD, A. M. *et al.* Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food Chem Toxicol**, New York, v.59, p.534-40, Sep. 2013.

BUCKLEY, J. P.; HERRING, A. H.; WOLFF, M. S. *et al.* Prenatal exposure to environmental phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai children's environmental health study. **Environ Int**, Amsterdam, v.91, p.350-6, May. 2016.

CALAFAT, A. M.; YE, X.; WONG, L. Y. *et al.* Urinary concentrations of triclosan in U. S. population: 2003-2004. **Environ Health Perspect**, Durhan, v.116, n.3, p.303-7, Mar.2008.

CAPDEVIELLE, M.; VAN EGMOND, R.; WHELAN, M. *et al.* Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. **Integr Environ Assess Manag**, Pensacola, v.4, n.1, p.15-23, Jan. 2008.

CHIAM, K.; TILLEY, W.D.; BUTLER, L. M. *et al.* The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam n. 1795, p. 104-109, Apr. 2009.

COSTER, S. D.; LAREBEKE, N. V. Endocrine-disruptors chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. **J Environ Public Health**, New York, v.2012, p.1-52, Sep. 2012.

CRAIG, Z. R.; WANG, W.; FLAWS, J. A. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. **Reproduction**, Cambridge, v.142, p.633-46, Nov. 2011.

CROFTON, K. M.; PAUL, K. B.; DEVITO, M. J. *et al.* Short-term *in vivo* exposure to water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environ Toxicol Pharmacol**, Amsterdam, v.24, n.2, p.194-7, Sep. 2007.

CULLINAN, M. P.; PALMER, J. E.; CARLE, A. D. *et al.* Long term use of triclosan toothpaste and thyroid function. **Sci Total Environ**, Amsterdam, n.416, p.75-79, Feb. 2012.

DANN, A. B.; HONTELA, A. Triclosan: enviromental exposure, toxicity and mechanisms of action. **J Appl Toxicol**, Philadelphia, v.31, n.4, p.285-311, May. 2011.

DAYAN, A. D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. **Food Chem Toxicol**, New York, v.45, n.1, p.125-9, Jan. 2007.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, Baltimore, v.30, n.4, p.293-342, Jun. 2009.

DOLINOY, D. C., HUANG, D., JIRTLE, R. L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.104, n. 32, p. 13056-61, Aug. 2007.

EPSTEIN, L. Fifty years since Silent Spring. **Annu Rev Phytopathol**, Palo Alto, v.52, p. 377-402, 2014.

FANG, J. L.; STINGLEY, R. L.; BELAND, F. A. *et al.* Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of Triclosan. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, New York, v.28, n.3, p.147-71, Jul. 2010.

FORAN, C. M.; BENNETT, E. R.; BENSON, W. H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. **Mar. Environ. Res**, Kidlington, v.50, n.1-5, p.153-6, Dec. 2000.

GEENS, T.; DIRTU, A. C.; DIRINCK, E. *et al.* Daily intake of bisphenol A and triclosan and their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight and obese individuals. **Environ Int**, Amsterdam, v.76, p.98-105, Mar. 2015.

GLASER, A. The ubiquitous Triclosan: a common antibacterial agent exposed. **Pesticides and you**, n.24, p.12-7, 2004.

HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A. K. The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human chorionic carcinoma JEG-3 cells. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.34, n.3, p.385-92, Nov. 2012

ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M. *et al.* Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v.67, n.2, p. 167-79, Apr. 2004.

JABLONSKA, O.; SHI, Z.; VALDEZ, K. E. *et al.* Temporal and anatomical sensitivities to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin leading to premature acyclicity with age in rats. **Int J Androl**, Copenhagen, v.33, n.2, p.405-12, Apr. 2010.

JUNG, E. M.; AN, B. S.; CHOI, K. C. *et al.* Potential estrogenic activity of triclosan in the uterus of immature rats and rat pituitary GH3 cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v.208, n.2, p.142-8, Jan. 2012.

JUNQUEIRA, L.C.U. Glândulas endócrinas. In: JUNQUEIRA, L.C.U (Eds). **Histologia básica**. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 349-350,1999.

KOEPPE, E. S.; FERGUSON, K. K.; COLACINO, J. A. *et al.* Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and sérum thyroid measures in NHANES 2007–2008. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v.445–446, p.299–305, Feb. 2013.

KUMAR, V.; CHAKRABORTY, A.; KURAL, M. R. *et al.* Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.27, n.2, p.177-85, Apr. 2009.

LOUIS, G. W.; HALLINGER, D. R.; STOKER, T. E. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rats. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.36, p.71-7, Apr. 2013.

ORVOS, D. R.; VERSTEEG, D.J.; INAUEN, J. *et al.* Aquatic toxicity of triclosan. **Environ Toxicol Chem**, New York, v.21, n.7, p.1338-49, Jul. 2002.

PALMLUND, I. Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.17, n.2, p.71-84, Jun. 1996.

PALMLUND, I.; APFEL, R.; BUITENDIJK, S. *et al.* Effects of diethylstilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th international congress of ISPOG. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.14, n.1, p.71-89, Mar. 1993.

PATEL, S.; ZHOU, C.; RATTAN, S. *et al.* Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary. **Biology of Reproduction**, New York, v. 93., n.1, p.1-9. Jun. 2015.

PATISAUL, H. B.; ADEWLE, H. B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Front Behav Neurosc**, Lousanne, p.3-10, Jun, 2009.

PAUL, K. B.; HEDGE, J. M.; BANSAL, R. *et al.* Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. **Toxicology**, Amsterdam, v.300, n.1-2, p.31-45, Oct. 2012.

PAUL, K. B.; HEDGE, J. M.; DEVITO, M. J. *et al.* Short-term exposure to triclosan decreases thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in young Long–Evans rats. **Toxicol Sci**, Orlando, v.113, n.2, p. 367–379, Feb. 2009.

ROMIJN, J. A. Endocrinology in the 21st century: unmasking the mysteries of biology. **Neth J Med**, Haarlem, v.55, n.6, p.271-75, Dec. 1999.

SAVAGE, J. H.; MATSUI, E. C.; WOOD, R. A. *et al.* Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v.130, n.2, p.453-60, Aug.2012.

SHEKHAR, S.; SOOD, S.; SHOWKAT, S. *et al.* Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. **Gen Comp Endocrinol**, New York, n.16, May. 2016.

STOUDER, C. & GIACOBINO-PAOLONI, A. Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine-disruptor methoxychlor on male gametes. **Society for Reproduction and Fertility**, Bristol, v.141, p.207-16, Feb. 2011.

TATARAZAKO, N.; ISHIBASHI, H.; TESHIMA, K. *et al.* Effects of triclosan on various aquatic organisms. **Environ Sci**, Tokyo, v.11,n.2, p.133-140, 2004.

UZUMCU, M.; ZAMA, A. M.; ORUC, E. Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: gonadal effects and role in the female reproduction. **Reprod Dom Anim**, Berlin, v.47, n.4, p.338-47, Aug. 2012.

VELDHOEN, N.; SKIRROW, R. C.; OSACHOFF, H. *et al.* The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 80, n.3, p.217-27, Dec.2006.

WALKER, W.F.J R.; HOMBERGER, D. G. *Anatomy & Dissection of the rat*. 3<sup>a</sup> ed. New York, W.H. Freeman and Company, p.122, 1997.

WANG, C. F, & TIAN, Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. **Environ Pollut**, Toronto, v.206, p.195-201, Nov. 2015.

WANG, X.; CHEN, X.; FENG, X. *et al.* Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of strongen sulfotransferase activity in humans and mice. **Sci Rep**, London, v.5, p. 507-13. Dec. 2015.

WEISS, L.; ARBUCKLE, T E.; FISHER, M. *et al.* Temporal variability and sources of triclosan exposure in pregnancy. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v.218, n.6, p.507-13, Aug. 2015.

WINDHAM, G. C.; LEE, D.; MITCHELL, P. *et al.* Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. **Epidemiology**, Cambridge, v.16, n.2, p.182-90, Mar. 2005.

XUE, J.; WU, Q.; SAKTHIVEL, S. *et al.* Urinary levels of endocrine disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens and triclosan in obese and non-obese Indian children. **Environ Res**, Amsterdam, v.137, p.120-8, Feb. 2015.

## **ARTIGO**

A presente dissertação originou o seguinte artigo:

**Maternal exposure of triclosan cause fetal development restriction, delay in the onset of puberty, dysregulation of the estrous cycle and reduction of folliculogenesis in rat offspring**

Eduardo Deon Fortunato<sup>1</sup>, Romário Willian Welter<sup>1</sup>, Guilherme Bitencourt<sup>1</sup>, Michael Aparecido Machado<sup>1</sup>, João Paulo de Arruda Amorim<sup>1</sup>, Elaine Manoela Porto Amorim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State University of Western Parana (UNIOESTE), Cascavel-PR, Brazil.

<sup>1</sup>Universitária Street, 2069 – Universitário, Cascavel/PR, Brazil. Zip code: 85819-110.

Tel.: +55 45 3220-7402; fax: +55 45 3220-3131

E-mail address: e\_laineporto@yahoo.com.br

## 1 RESUMO

2  
3 Triclosan (TCS) é um antimicrobiano utilizado em produtos industrializados, tendo sido  
4 incluído na lista dos desreguladores endócrinos pelos efeitos adversos observados na fauna  
5 aquática, mamíferos e humanos. Este estudo avaliou os efeitos da exposição materna ao TCS,  
6 durante a prenhez e a lactação, no desenvolvimento físico, instalação da puberdade e  
7 morfofisiologia ovariana da prole feminina. Para tanto, ratas prenhes foram tratadas com  
8 diferentes concentrações de TCS variando entre 75mg/kg/dia, 150mg/kg/dia, 300mg/kg/dia e  
9 grupo controle. Resultados obtidos revelaram que o peso médio da ninhada foi  
10 significativamente menor em todos os grupos tratados com TCS; os animais de todos os  
11 grupos apresentaram atraso no dia da abertura vaginal e do primeiro estro, atraso na instalação  
12 da puberdade, redução no número de ciclos estrais e menor atividade foliculogênica associada  
13 com o aumento da dose. Conclui-se que o TCS causa atraso na instalação da puberdade,  
14 desregulação do ciclo estral e redução da atividade foliculogênica.

15  
16 **Palavras-chave:** Triclosan, desreguladores endócrinos, ovário, rato.

## 19 1. INTRODUÇÃO

20 O triclosan é um antimicrobiano de amplo espectro utilizado em larga escala em países  
21 americanos, europeus e asiáticos. O TCS é uma substância química com propriedades  
22 fungistática e bacteriostática utilizada como componente de dentifrícios, enxaguatórios bucais,  
23 sabonetes, desodorantes, cremes, xampus, entre outros produtos de higiene pessoal, bem  
24 como produtos industrializados, veterinários e de limpeza geral, nos quais incluem-se  
25 detergentes, desinfetantes, plásticos, brinquedos, palmilhas de calçados e produtos que entram  
26 em contato com os alimentos (STOKER *et al.*, 2010; DANN & HONTELA, 2011;  
27 CULLINAN *et al.*, 2012).

28 Majoritariamente, a população é exposta ao TCS através do contato dermatológico, no  
29 uso diário de produtos de higiene oral e corporal, além do consumo de alimentos e água  
30 contaminados por este composto (FANG *et al.*, 2010). O fato de o TCS ser utilizado em larga  
31 escala pela indústria na manufatura de diferentes produtos faz com que esta substância seja  
32 frequentemente encontrada como um poluente nas águas dos rios, lagos e oceanos, sugerindo  
33 extensa contaminação dos ecossistemas aquáticos e bioacumulação na biota (TATARAZAKO

34 *et al.*, 2004). A identificação e a quantificação do TCS no plasma sanguíneo, leite materno e  
35 na urina de seres humanos confirmam seu demasiado uso e a exposição humana a este  
36 composto (ZORILLA *et al.*, 2009; PAUL *et al.*, 2012). Em humanos, a principal via de  
37 absorção ocorre através da mucosa oral e do trato gastrointestinal, no entanto, a meia vida  
38 biológica no plasma e na urina é de 21 e 11 horas, respectivamente. O TCS é um composto  
39 solúvel em gordura, que sofre bioacumulação no tecido adiposo (HONKISZ *et al.*, 2012;  
40 GEENS *et al.*, 2015).

41 No contexto da Odontologia, o TCS é utilizado como matéria prima na fabricação de  
42 dentifrícios e enxaguatórios bucais, tipicamente em concentração máxima de 0,3% (DANN &  
43 HONTELA, 2011). A literatura tem revelado que o triclosan se mostra eficaz na redução do  
44 biofilme dental e da gengivite (PANCER *et al.*, 2016), além de controlar a progressão da  
45 doença periodontal crônica (GUPTA *et al.*, 2016). Estas propriedades estão relacionadas com  
46 a ação do TCS contra uma ampla variedade de bactérias formadoras do biofilme dental,  
47 principal fator etiológico de patologias periodontais (NABI *et al.*, 1989).

48 A facilidade de exposição com que a população tem de entrar em contato com TCS,  
49 bem como a comprovada presença em tecidos e fluídos corporais pode ter sério impacto sobre  
50 a saúde humana (CALAFAT *et al.*, 2008). Diversos estudos vêm sugerindo o TCS como um  
51 desregulador endócrino (DE) (PAUL *et al.*, 2009; STOKER *et al.*, 2010; HONKISZ *et al.*,  
52 2012; COSTER & LAREBEKE, 2012; LAN *et al.*, 2013). Os desreguladores endócrinos,  
53 dentre eles o TCS, constituem uma classe de compostos que podem causar disfunções  
54 reprodutivas importantes no sexo masculino e, possivelmente, no sexo feminino. Existe um  
55 crescente interesse na comunidade científica, em se estudar estes agentes químicos, já que  
56 muitos são encontrados com frequência na natureza e em produtos utilizados no cotidiano da  
57 população. O conceito de que a exposição aos fatores ambientais, incluindo os desreguladores  
58 endócrinos, durante o período fetal e neonatal, pode interagir com o genoma e influenciar o  
59 desenvolvimento de doenças que aparecem tardiamente na vida do indivíduo, incluindo  
60 câncer e infertilidade, tem ganhado uma grande importância nas pesquisas.

61 Recentes estudos revelam que o TCS é capaz de alterar a regulação e a ação de  
62 hormônios da tireoide em anfíbios e ratos (VELDHOEN *et al.*, 2006; CROFTON *et al.*, 2007;  
63 PAUL *et al.*, 2012; AXELTAD *et al.*, 2013); devido ao fato da similaridade entre os  
64 hormônios secretados pela glândula tireoide e a fórmula química estrutural do TCS. Ambas as  
65 substâncias são éteres com dois anéis aromáticos halogenados, podendo, o triclosan,  
66 mimetizar a presença de tiroxina (T<sub>4</sub>) circulante pelo corpo. Outros trabalhos demonstraram o  
67 aumento do risco de câncer associado ao triclosan (DARBRE, 2006; DINWIDIE *et al.*, 2014)

68 e sua ação anti-androgênica sobre o sistema reprodutor masculino de ratos (CHEN *et al.*,  
69 2007; KUMAR *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2016).

70 A comprovada ação anti-androgênica do triclosan descrita na literatura contrasta com  
71 os escassos experimentos de sua ação sobre o sistema reprodutor feminino. Recentes trabalhos,  
72 em modelos animais, relatam a possível atuação do TCS durante a gestação, sobre o feto em  
73 desenvolvimento (WEISS *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2016; SHEKHAR *et al.*, 2016) e sobre o  
74 sistema reprodutor feminino (HONKISZ *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2015), relataram pela  
75 primeira vez que a exposição ao triclosan, durante a gestação, em humanos e em ratos,  
76 acarretaria no declínio da concentração da enzima estrogênio sulfotransferase, levando a um  
77 aumento de casos de aborto espontâneo e retardo no crescimento fetal.

78 Dados específicos quanto aos mecanismos de ação do TCS sobre o sistema reprodutor  
79 feminino ainda pouco esclarecidos na literatura, bem como os efeitos da exposição indireta do  
80 TCS sobre o tecido ovariano. Diante desta realidade, questionam-se quais as possíveis  
81 consequências da exposição materna ao triclosan para a morfofisiologia ovariana da prole,  
82 tornando esse trabalho atual, pois a preocupação com os danos que o homem vem causando  
83 ao ambiente vem aumentando e um dos aspectos que mais vem crescendo com este fato é a  
84 infertilidade. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos decorrentes da  
85 exposição materna ao triclosan durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, na  
86 instalação puberdade e na morfofisiologia ovariana da prole feminina de rato.

87

88

## 89 **2. METODOLOGIA**

90

### 91 **2.1 Animais**

92 Doze ratos machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g), e  
93 trinta e duas fêmeas adultas (90 dias de idade, pesando aproximadamente 250g), da variedade  
94 *Wistar*, foram adquiridos do Biotério Central da Unioeste. Os animais foram adaptados e  
95 mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e  
96 da Saúde – CCBS-, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR,  
97 em gaiolas coletivas de polietileno (medindo 43x30x15cm), sendo acomodados  
98 individualmente ou em duplas, sob condições controladas de temperatura, mantida entre 22° e  
99 25°C, umidade relativa do ar próxima de 55% e fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00  
100 ~19:00h). Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas editadas pelo

101 Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê  
102 de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (ver anexo 1).

103

## 104 **2.2 Acasalamento e obtenção de fêmeas prenhes**

105 Os acasalamentos naturais foram realizados no período escuro do ciclo estral  
106 colocando duas fêmeas (em proestro) na caixa de cada macho, ao final da tarde. Na manhã  
107 subsequente, foram colhidos lavados vaginais e a presença de espermatozoides associado à  
108 fase do ciclo estral (fêmeas em estro) foi utilizada como fatores indicativos de prenhez, e este  
109 considerado dia zero da gestação (DG 0). As fêmeas prenhes foram divididas em quatro  
110 grupos experimentais, conforme descrito abaixo.

111

## 112 **2.3 Grupos experimentais, droga, dose e via de administração**

113 O tratamento com triclosan se deu a partir do 8º dia gestacional (DG8), até o 21º dia  
114 pós-natal. As fêmeas prenhes foram tratadas uma vez ao dia (entre 8:00-9:00h), por via oral  
115 (através de gavagem intragástrica), durante a prenhez e lactação da seguinte forma: Grupo I  
116 (GI): composto por 8 ratas do grupo controle que receberam somente óleo de milho nas  
117 mesmas condições experimentais dos demais grupos; Grupo II (GII): composto por 8 ratas  
118 que receberam TCS (CAS#3380-34-5,  $\geq 97,0\%$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído  
119 em óleo de milho, na dose de 75mg/kg/dia; Grupo III (GIII): composto por 8 ratas que  
120 receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 150mg/kg/dia; Grupo IV (GIV):  
121 composto por 8 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300mg/kg/dia.  
122 As três doses selecionadas foram escolhidas baseadas em estudo toxicológico prévio  
123 conduzido por Crofton *et al.* (2007) e estão abaixo da LD50 para ratos (via oral, LD50: 5000  
124 mg/kg), conforme descrito por Bhargava & Leonard (1996).

125 Para a avaliação indireta da toxicidade materna, e cálculo do ajuste da dose a ser  
126 administrada, as ratas foram pesadas em dias alternados para controle de ganho de peso  
127 corporal. A partir do 20º dia de prenhez, as ratas foram monitoradas quanto ao nascimento dos  
128 filhotes. Em seguida, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, procurando  
129 sempre manter o maior número de fêmeas possível. O desmame foi realizado no 21º dia pós-  
130 natal. Após o desmame as ratas mães foram eutanasiadas por decapitação em guilhotina.

131

## 132 **2.4 Avaliação dos sinais físicos externos e do desenvolvimento inicial**

133 Ocorreu de acordo com metodologia descrita em Smart & Dobbing (1971). Após o  
134 nascimento da prole feminina, para avaliação do desenvolvimento físico foram observadas  
135 diariamente do 1º ao 20º dia pós-natal (DPN) os seguintes parâmetros: peso, idade de abertura  
136 de olhos, idade de erupção dos dentes incisivos, aparecimento de pêlos e descolamento das  
137 orelhas. Para evitar rejeição materna dos filhotes (HOLEMANS *et al.*, 1999), o peso corporal  
138 da prole foi avaliado a partir do DPN 3.

139

## 140 **2.5 Grupos experimentais da prole**

141 Os grupos experimentais da prole formados foram os mesmos das mães: grupo  
142 controle (n=8, sendo um indivíduo da prole feminina por rata mãe) e demais grupos tratados  
143 com TCS nas diferentes doses (sendo, n=8 para cada grupo de rata mãe tratada, sendo um  
144 indivíduo da prole feminina por rata).

145

## 146 **2.6 Análise da instalação da puberdade**

147 Nos filhotes do sexo feminino, foi determinado o dia médio, em que ocorreu a  
148 abertura vaginal e o 1º estro, indicativos da instalação da puberdade. As observações se  
149 iniciaram a partir do DPN 30. Para se investigar a idade do primeiro estro, foram colhidos  
150 lavados vaginais de todos os filhotes do sexo feminino. Para tanto, e sempre no mesmo  
151 horário, uma ponteira contendo 10µL de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) acoplada a um  
152 pipetador automático foi introduzida na vagina das ratas, e o líquido transferido e logo depois  
153 aspirado (MARCONDES *et al.*, 2002). Os lavados vaginais foram espalhados sobre lâminas  
154 histológicas limpas e identificadas com o número do animal, analisados com o auxílio de  
155 microscópio óptico (Olympus CBA), e verificado a presença de células típicas da fase de estro  
156 (GOLDMAN *et al.*, 2007).

157

## 158 **2.7 Análise do ciclo estral**

159 Para se investigar a regularidade do ciclo estral, foram colhidos lavados vaginais de  
160 todos os filhotes. Para tanto, sempre no mesmo horário, uma ponteira contendo 10µL de  
161 solução fisiológica (NaCl, 0,9%) acoplada a um pipetador automático foi introduzida na  
162 vagina das ratas, e o líquido transferido e logo depois aspirado (MARCONDES *et al.*, 2002).  
163 Em seguida, os lavados vaginais foram espalhados sobre lâminas histológicas limpas e  
164 previamente identificadas com o número do animal e analisados com o auxílio de um  
165 microscópio óptico. A regularidade do ciclo estral que, na rata, dura em média 4 a 5 dias, foi

166 estudada em todas as ratas a partir do DPN 69 até o 90. A classificação da fase do ciclo em  
167 proestro, estro, metaestro e diestro, foi baseada nos parâmetros descritos por (GOLDMAN *et*  
168 *al.*, 2007).

169

## 170 **2.8 Eutanásia e coleta de material biológico**

171 Na idade adulta (90 dias de idade), as fêmeas em estro foram pesadas e eutanasiadas  
172 por decapitação em guilhotina. Os animais foram submetidos à laparotomia abdômino-pélvica  
173 para remoção dos órgãos reprodutores (útero, ovários e tubas uterinas) que foram dissecados,  
174 pesados e posteriormente fixados.

175

## 176 **2.9 Análise morfológica do ovário**

177 Para esta análise, onde foram avaliados diferentes parâmetros estruturais, os ovários  
178 esquerdos foram fixados em formalina 10%, processados com metodologia adequada para  
179 microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, USA). Para as análises  
180 histológicas, foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura, utilizando  
181 micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço. Foi selecionada  
182 uma secção do ovário e desprezadas outras dez subsequentes ao longo de todo o órgão,  
183 perfazendo-se uma média de 10secções/fêmea/grupo. Os cortes obtidos foram  
184 desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de  
185 coloração hematoxilina-eosina (HE) para análise. Foram identificados, contados e analisados  
186 os folículos primordiais, primários, em crescimento (com mais de três camadas de células  
187 foliculares), pré-antrais, antrais e maduros (LARA *et al.*, 2000).

188

## 189 **2.10 Análise dos Resultados**

190 Foi utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a  
191 posteriori” de Tukey ou o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com teste “a posteriori”  
192 de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas  
193 estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no  
194 programa SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

195

196

197

198

199 **3. RESULTADOS**

200

201 **3.1 Parâmetros maternos**

202 A média do peso corporal foi semelhante entre os grupos no início do período  
 203 experimental. O ganho de peso corporal ao longo da gestação foi semelhante entre os grupos  
 204 experimentais. Entretanto, o peso corporal ao fim do período da lactação foi menor nas ratas  
 205 do grupo tratado com 300mg/kg/dia de TCS, quando comparadas ao grupo controle. O tempo  
 206 médio de gestação, assim como o tamanho da ninhada não diferiu entre os grupos  
 207 experimentais (tabela 1).

208

209 **Tabela 1.** Parâmetros maternos avaliados nas ratas dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Massa corpórea no início da prenhez (g)	241,63±7,52 <sup>a</sup>	240,33±5,71 <sup>a</sup>	238,45±6,15 <sup>a</sup>	240,45±8,05 <sup>a</sup>
Massa corpórea no final da prenhez (g)	293,34±16,16 <sup>a</sup>	287,09±17,52 <sup>a</sup>	293,33±18,58 <sup>a</sup>	264,51±15,13 <sup>b</sup>
Ganho de massa corpórea na gestação (g)	89,33±10,34 <sup>a</sup>	87,25±13,15 <sup>a</sup>	88,12±8,67 <sup>a</sup>	84,56±9,65 <sup>a</sup>
Tempo de gestação (dias)	22,05±1,34 <sup>a</sup>	23,12±1,04 <sup>a</sup>	22,55±0,98 <sup>a</sup>	23,06±1,02 <sup>a</sup>
Tamanho da ninhada (n)	11,3±0,87 <sup>a</sup>	10,01±1,01 <sup>a</sup>	9,45±0,98 <sup>a</sup>	11,02±0,89 <sup>a</sup>

210 Valores expressos em média ± desvio padrão. DPN= dia pós-natal. n materno= 8 animais/grupo.

211 Análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes <sup>a,b</sup>= p<0,05.

212 **3.2 Avaliação do desenvolvimento físico da prole feminina**

213 O peso médio da ninhada foi significativamente menor em todos os grupos tratados  
 214 com TCS, quando comparados ao controle. As idades de descolamento das orelhas,  
 215 nascimento de pêlos, erupção dos dentes incisivos e abertura dos olhos foram semelhantes  
 216 entre os grupos experimentais (tabela 2).

217

218 **Tabela 2.** Peso corporal da ninhada e avaliação dos sinais do desenvolvimento físico da prole.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Peso médio (g) da ninhada DPN3	8,40±0,67 <sup>a</sup>	5,95±0,84 <sup>b</sup>	6,5±0,61 <sup>b</sup>	6,09±0,71 <sup>b</sup>
Idade de descolamento das orelhas (dias)	2,83±0,41 <sup>a</sup>	3,01±0,20 <sup>a</sup>	2,85±0,38 <sup>a</sup>	3,00±0,40 <sup>a</sup>
Idade de nascimento de pêlos (dias)	7,16±1,36 <sup>a</sup>	7,98±0,95 <sup>a</sup>	7,80±0,77 <sup>a</sup>	7,20±1,25 <sup>a</sup>
Idade de erupção dos dentes incisivos (dias)	7,50±1,19 <sup>a</sup>	8,05±1,21 <sup>a</sup>	8,50±1,15 <sup>a</sup>	7,89±0,99 <sup>a</sup>
Idade de abertura dos olhos (dias)	13,01±0,85 <sup>a</sup>	13,04±0,87 <sup>a</sup>	13,25±0,88 <sup>a</sup>	14,01±0,85 <sup>a</sup>

219 Valores expressos em média ± desvio padrão. DPN: dia pós-natal. n= 8 ninhada/ grupo. Análise  
 220 de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes <sup>a,b</sup>= p<0,05.

221

222

223 **3.3 Avaliação da instalação da puberdade da prole feminina**

224 As fêmeas de todos os grupos expostas durante a gestação e lactação ao TCS,  
 225 apresentaram atraso nas idades de abertura vaginal e do primeiro estro em todos os grupos  
 226 tratados com TCS, quando comparados com os animais do grupo controle (tabela 3).

227 **Tabela 3.** Parâmetros de instalação da puberdade da prole feminina exposta ao TCS.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Idade da abertura vaginal (dias)	36,73±0,47 <sup>a</sup>	39,82±0,40 <sup>b</sup>	39,64±0,50 <sup>b</sup>	39,55±0,52 <sup>b</sup>
Idade do primeiro estro (dias)	41,17±0,41 <sup>a</sup>	46,15±0,50 <sup>b</sup>	45,19±0,48 <sup>b</sup>	45,27±0,40 <sup>b</sup>

228 Valores expressos em média ± desvio padrão. DPN: dia pós-natal. n= 8 animais/ grupo. Análise  
229 de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes <sup>a,b</sup>= p<0,05.

230

231

232 **3.4 Análise do ciclo estral da prole**

233 A prole feminina de todos os grupos expostos durante a gestação e lactação ao TCS,  
234 apresentaram desregulação do ciclo estral. Os resultados demonstram que os animais de todos  
235 os grupos tratados com TCS apresentaram redução na duração dos ciclos estrais, diminuição  
236 da frequência da fase proestro e aumento da frequência na fase metaestro, quando  
237 comparados com o grupo controle (tabela 4).

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251 **Tabela 4.** Duração do ciclo estral e frequência em cada fase do ciclo no período de 21 dias  
 252 consecutivos da prole feminina exposta ao TCS durante a gestação e lactação.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Duração do ciclo estral (dias)	4,00±0,10 <sup>a</sup>	5,68±0,23 <sup>b</sup>	5,88±0,20 <sup>b</sup>	5,48±0,19 <sup>b</sup>
Frequência em proestro (dias)	5,30±0,15 <sup>a</sup>	3,63±0,15 <sup>b</sup>	3,42±0,10 <sup>b</sup>	3,25±0,10 <sup>b</sup>
Frequência em estro (dias)	5,50±0,16 <sup>a</sup>	4,83±0,56 <sup>a</sup>	4,43±0,56 <sup>a</sup>	4,41±0,56 <sup>a</sup>
Frequência em metaestro (dias)	0,70±0,26 <sup>a</sup>	3,36±0,43 <sup>b</sup>	3,43±0,23 <sup>b</sup>	3,48±0,16 <sup>b</sup>
Frequência em diestro (dias)	9,50±0,16 <sup>a</sup>	9,18±0,67 <sup>a</sup>	9,72±0,47 <sup>a</sup>	9,86±0,56 <sup>a</sup>

253 Valores expressos em média ± desvio padrão. n= 8 animais/ grupo. Análise de variância -  
 254 ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes <sup>a,b</sup>= p<0,05.

255

256

### 257 **3.5 Contagem dos folículos do ovário – função ovariana**

258 Os ovários da prole de mães expostas ao triclosan apresentaram menor número de  
 259 folículos primordiais, primários, em crescimento, pré-antrais, antrais e maduros quando  
 260 comparados com o grupo controle. Os grupos tratados revelaram menor atividade  
 261 foliculogênica à medida que a dose de triclosan aumentava, sendo frequente a diferença  
 262 estatística entre os grupos tratados e controle (Tabela 5).

263

264

265

266

267 **Tabela 5.** Contagem de folículos ovarianos da prole feminina exposta ao triclosan durante a  
 268 gestação e lactação.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Folículo Primordial	244,40±12,77 <sup>a</sup>	217,40±9,39 <sup>b</sup>	196,60±6,73 <sup>c</sup>	189,60±6,42 <sup>c</sup>
Folículo Primário	193,40±4,21 <sup>a</sup>	178,40±4,66 <sup>b</sup>	167,20±4,14 <sup>c</sup>	157,20±7,56 <sup>d</sup>
Folículo em crescimento	115,20±6,44 <sup>a</sup>	114,40±9,55 <sup>a</sup>	87,40±3,71 <sup>b</sup>	85,40±7,70 <sup>b</sup>
Folículo pré-antral	30,60±2,51 <sup>a</sup>	29,80±2,38 <sup>a</sup>	25,20±2,28 <sup>b</sup>	20,40±2,07 <sup>c</sup>
Folículo Antral	25,00±2,23 <sup>a</sup>	23,40±2,88 <sup>ab</sup>	20,20±1,58 <sup>bc</sup>	15,80±2,28 <sup>abc</sup>
Folículo Maduro (Graaf)	20,20±0,83 <sup>a</sup>	15,80±2,16 <sup>a</sup>	13,60±1,14 <sup>a</sup>	12,20±0,83 <sup>ab</sup>

269 Valores expressos em média ± desvio padrão. n= 8 animais/grupo. Análise de variância -  
 270 ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes <sup>a,b,c,d</sup>= p<0,05.

271

272

## 273 4. DISCUSSÃO

274

275 A população está exposta ao triclosan através do contato dermatológico, pelo uso  
 276 diário de artefatos de higiene oral e corporal, além do consumo de alimentos e água  
 277 contaminados pela substância (FANG *et al.*, 2010). A comprovação está na gama de trabalhos  
 278 que têm encontrado e quantificado a presença de TCS em fluídos e tecidos corporais desde o  
 279 início dos anos 2000, em amostras de plasma sanguíneo (ALLMYR *et al.*, 2006), leite  
 280 materno (DAYAN, 2007), urina (BUCKLEY *et al.*, 2016) e líquido amniótico (SHEKHAR *et*  
 281 *al.*, 2016). Embora as informações disponíveis atualmente na literatura sejam contraditórias e  
 282 incompletas, os trabalhos experimentais suportam a teoria de que o TCS é um desregulador  
 283 endócrino (WANG & TIAN, 2015).

284 No presente estudo, o ganho de peso corporal das ratas prenhes ao longo da gestação  
 285 foi semelhante entre os diferentes grupos. No entanto, o peso corporal da rata prenhe ao final  
 286 do período experimental foi menor no grupo exposto a 300mg/kg/dia de TCS, quando

287 comparado ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de  
288 Axeltad *et al.* (2013) e Feng *et al.* (2016), no qual a diminuição do ganho de peso corporal foi  
289 inversamente proporcional ao aumento da dose de exposição ao antimicrobiano TCS,  
290 principalmente em exposições superiores a 300mg/kg/dia; onde a diminuição de peso ao final  
291 do período gestacional está relacionada à bioacumulação de TCS no tecido placentário,  
292 fazendo da placenta um órgão alvo do antimicrobiano no organismo, perturbando a secreção  
293 hormonal placentária diminuindo a secreção de progesterona e testosterona (substrato para a  
294 secreção de estrogênio no corpo-lúteo) (FENG *et al.*, 2016); sendo estes hormônios  
295 fundamentais para a manutenção e desenvolvimento da gestação, provocando diminuição do  
296 peso da ninhada e/ou morte fetal e, por consequência, diminuição do peso da rata prenhe ao  
297 final do período gestacional.

298 Os resultados revelaram que o peso médio da ninhada foi significativamente menor  
299 em todos os grupos tratados com TCS. Outros trabalhos já comprovaram que o aumento da  
300 dose na exposição experimental ao TCS é diretamente proporcional à diminuição do peso  
301 corporal da ninhada (RODRIGUEZ & SANCHEZ, 2010; WANG *et al.*, 2015), bem como a  
302 ocorrência de má formação congênita e aumento do número de morte fetal, chegando a 30%  
303 de óbitos (WEI *et al.*, 2017). Fatores como trombose, hemorragias, necrose tecidual e atrofia  
304 da zona juncional placentária, provocadas pela alteração das concentrações de estrogênio  
305 livre e sulfonado, seriam responsáveis pela desregulação homeostática local (JAMES *et al.*,  
306 2010). Nesse contexto, sabe-se que o TCS causa inibição da enzima estrogênio  
307 sulfotransferase, provocando o aumento das concentrações de fibrina plasmática, agregação  
308 plaquetária induzida por ADP (adenosina-difosfato) e declínio no tempo de protrombina  
309 parcial e tempo de tromboplastina (JAMES *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015), diminuindo o  
310 fluxo sanguíneo placentário durante a gestação, acarretando em prejuízo no desenvolvimento  
311 fetal e baixo peso ao nascer, assim como verificado nos animais do presente estudo.

312 Somada a restrição da disponibilidade de nutrientes e oxigênio em fases cruciais do  
313 desenvolvimento fetal, a exposição ao TCS também está associada ao hipotireoidismo  
314 gestacional (Wang *et al.*, 2015). Essa condição resulta na diminuição das concentrações de T4  
315 circulantes, redução da proliferação celular placentária e restrição do crescimento placentário,  
316 que por consequência, causa diminuição do peso fetal (CAO *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2017),  
317 confirmando o que foi demonstrado no presente estudo.

318 A prole feminina dos diferentes grupos expostos ao TCS apresentaram atraso na  
319 instalação da puberdade. Os hormônios tireoidianos (T3 e T4) e o hormônio estimulante da  
320 tireoide (TSH) são reguladores do metabolismo, do desenvolvimento e do crescimento

321 corporal, possuindo importante papel no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e  
322 masculino, principalmente no período da puberdade (DOUFAS & MASTORAKOS, 2000). É  
323 consenso na literatura que ocorre aumento da conversão de T4 em T3 bioativo no período  
324 inicial da puberdade sendo que, atrasos na instalação dos eventos de instalação da puberdade  
325 estariam relacionados com o hipotireoidismo na infância e pré-adolescência (WEBER *et al.*,  
326 2003), como é o caso dos animais expostos ao TCS durante a prenhez e lactação (PAUL *et al.*,  
327 2009; PAUL *et al.*, 2012). Além disso, está comprovado que a instalação da puberdade  
328 feminina está diretamente relacionada à ação do estrógeno no sistema reprodutor (STOCKER  
329 *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2012) e da ação dos hormônios tireoidianos no hipotálamo  
330 (CROFTON *et al.*, 2007; ZORRILA *et al.*, 2009; PAUL *et al.*, 2012). Diversos estudos já  
331 comprovaram que TCS possui atividade estrogênica, agindo sobre os receptores de estrógeno  
332 e alterando as concentrações desse hormônio no organismo (ISHIBASHI *et al.*, 2004;  
333 STOCKER *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2012). Assim, o aparente desequilíbrio das  
334 concentrações hormonais, provocado pela exposição ao TCS devido à semelhança estrutural  
335 de suas moléculas químicas, provoca alterações significativas nos eventos de início da  
336 puberdade, desenvolvimento e amadurecimento sexual do indivíduo.

337 Os detalhes da forma pela qual a desregulação de hormônios tireoidianos alteram a  
338 regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal provocando desordem na instalação da  
339 puberdade na fêmea não são completamente compreendidos, necessitando maiores  
340 investigações para esclarecimentos sobre o assunto (KUMAR *et al.*, 2009; RODRIGUEZ &  
341 SANCHEZ, 2010). No entanto, acredita-se que o aparente desequilíbrio na disponibilidade  
342 hormonal provocado pela exposição de TCS levaria à inibição do feedback de secreção de  
343 estrógeno ao nível dos receptores hormonais no hipotálamo; condição responsável pela  
344 diminuição da secreção de estrógeno e sua disponibilidade na corrente sanguínea, como  
345 consequência da exposição prolongada do indivíduo a uma substância com efeitos  
346 estrogênicos ou efeitos sobre os receptores de estrógeno no sistema reprodutor feminino,  
347 como é o caso do antimicrobiano triclosan (STOCKER *et al.*, 2010).

348 A literatura é clara acerca do envolvimento do TCS no hipotireoidismo em modelos  
349 animais e humanos (PAUL *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015). Por sua vez, o hipotireoidismo  
350 reduz a fertilidade, causando anormalidades do ciclo estral, as quais são consequências do  
351 aumento de secreção de prolactina durante as fases de proestro e estro do ciclo estral  
352 (HAPÓN *et al.*, 2003). No presente estudo, a prole feminina de todos os grupos expostos TCS  
353 durante a prenhez e lactação, apresentaram desregulação do ciclo estral, com redução na  
354 duração dos ciclos, diminuição da frequência da fase proestro e aumento da frequência na fase

355 metaestro. Sabe-se que a hiperprolactinemia gestacional, induzida pelo hipotireoidismo, reduz  
356 a resposta de GnRH na hipófise dificultando a secreção pulsátil de FSH e LH no hipotálamo,  
357 aumentando as chances da ocorrência de falhas na gestação pelo atraso no desenvolvimento  
358 do corpo lúteo logo após a ovulação e da secreção de progesterona (HAPÓN, GAMARRA-  
359 LUQUES & JAHN, 2010), justificando a redução da duração da fase de proestro e o aumento  
360 da fase de metaestro em nosso trabalho. Além disso, o mesmo estudo revelou diminuição da  
361 expressão de receptores ováricos (membros da família GH / IGF) e aumento da aromatase  
362 CYP19A1 (uma das principais enzimas responsáveis pela conversão do colesterol em  
363 estrógeno), elevando as concentrações de estrógeno nas fases proliferativas de proestro e  
364 estro.

365 Em nosso trabalho, os animais tratados com diferentes doses de TCS apresentaram  
366 diminuição do número de folículos ovarianos, em todos os estágios de maturação. O aumento  
367 das concentrações de TSH observado durante o hipotireoidismo gestacional parece estar  
368 relacionado com o desequilíbrio da ativação da função gonadal, através da indução dos  
369 receptores de FSH (hormônio folículo estimulante), pela semelhança estrutural de suas  
370 cadeias moleculares (NIEDZIELA & KORMAN *et al.*, 2001); somando evidências de que o  
371 triclosan é um desregulador endócrino para o sistema reprodutor feminino.

372 Durante o hipotireoidismo observa-se aumento da atividade de GnIH (hormônio  
373 inibidor de gonodotrofina), principal responsável pelo controle de secreção de GnRH no  
374 hipotálamo. Esta interação multinível entre dois eixos hipotalâmicos diferentes confere aos  
375 neurônios GnIH a sensibilidade estimulatória para hormônios tireoidianos, que conseguem  
376 reconhecer sinais em sua membrana e citoplasma. As alterações no processo de secreção ou  
377 diminuição da produção de GnRH provoca resposta hipofisiária de diminuição de produção  
378 de FSH, que somado aos altos índices de TSH durante o hipotireoidismo, alteraria a resposta  
379 ovariana, e assim a foliculogênese, e por consequência, a fertilidade feminina (KIYOHARA  
380 *et al.*, 2017), do mesmo modo como observado em nosso experimento.

381

## 382 **5. CONCLUSÃO**

383 Concluimos que a exposição materna ao triclosan, durante a prenhez e a lactação causa  
384 restrição de crescimento intrauterino, atraso na instalação da puberdade, desregulação do ciclo  
385 estral e redução da atividade foliculogênica na prole de ratos.

386

387

388        **6. AGRADECIMENTOS**

389

390            Os autores agradecem a Clislaine Aparecida Tavares pelos serviços técnicos  
391 laboratoriais.

392

393        **7. FINANCIAMENTO**

394            Este trabalho foi financiado pela CAPES.

395

396        **8. CONFLITO DE INTERESSE**

397

398            Os autores declaram não haver conflito de interesse.

399

400        **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

401

402 ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M. S. *et al.* Triclosan in plasma  
403 and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. **Sci**  
404 **Total Environ**, Amsterdam, v.372, n.1, p.87-93, Dec. 2006.

405

406 AXELTAD, M.; BOBERG, J.; VINGGAARD, A. M. *et al.* Triclosan exposure reduces  
407 thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food**  
408 **Chem Toxicol**, New York, v.59, p.534-40, Sep. 2013.

409

410 BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A. Triclosan: applications and safety. **Am J Infect**  
411 **Control**, Saint Louis, v. 24, p. 209-218, 1996.

412

413 BUCKLEY, J. P.; HERRING, A. H.; WOLFF, M. S. *et al.* Prenatal exposure to  
414 environmental phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai children's environmental  
415 health study. **Environ Int**, Amsterdam, v.91, p.350-6, May. 2016.

416

417 CALAFAT, A. M.; YE, X.; WONG, L. Y. *et al.* Urinary concentrations of triclosan in U. S.  
418 population: 2003-2004. **Environ Health Perspect**, Durhan, v.116, n.3, p.303-7, Mar. 2008.

- 419  
420 CAO, X.; HUA, X.; WANG, X. *et al.* Exposure of pregnant mice to triclosan impairs  
421 placental development and nutrient transport. **Sci Reports, London**, v.7, Mar. 2017.  
422
- 423 CHEN, J.; AHN, K. G.; GEE, N.A.; *et al.* Antiandrogenic properties of parabens and other  
424 phenolic containing small molecules in personal care products. **Toxicol Appl Pharmacol**,  
425 New York, v.221, n.3, p.278-84, Jun. 2007.  
426
- 427 COSTER, S. D.; LAREBEKE, N. V. Endocrine-disruptors chemicals: Associated disorders  
428 and mechanisms of action. **J Environ Public Health**, New York, v.2012, p.1-52, Sep. 2012.  
429
- 430 CROFTON, K. M.; PAUL, K. B.; DEVITO, M. J. *et al.* Short-term *in vivo* exposure to water  
431 contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environ Toxicol Pharmacol**,  
432 Amsterdam, v.24, n.2, p.194-7, Sep. 2007.  
433
- 434 CULLINAN, M. P.; PALMER, J. E.; CARLE, A. D. *et al.* Long term use of triclosan  
435 toothpaste and thyroid function. **Sci Total Environ**, Amsterdam, n.416, p.75–79, Feb. 2012.  
436
- 437 DANN, A. B.; HONTELA, A. Triclosan: enviromental exposure, toxicity and mechanisms of  
438 action. **J Appl Toxicol**, Philadelphia v.31, n.4, p.285-311, May. 2011.  
439
- 440 DARBRE, P. D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast câncer. **Best Pract Res Clin**  
441 **Endocrinol Metab**, Amsterdam, v.20, n.1, p.121-43, Mar. 2006.  
442
- 443 DAYAN, A. D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. **Food Chem**  
444 **Toxicol**, New York, v.45, n.1, p.125-9, Jan. 2007.  
445
- 446 DINWIDIE, M .T.; TERRY, P. D.; CHEN, J. Recent evidence regarding trilosan and cancer  
447 risk. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v.11, n.2, p.2209-17, Feb. 2014.  
448
- 449 DOUFAS, A. G. & MASTORAKOS, G. The hypothalamic-pytuitary-thyroid axis and the  
450 female reproductive system. **Ann NY Acad Sci**, New York, v.900, p.65-76, 2000.  
451

- 452 FANG, J. L.; STINGLEY, R. L.; BELAND, F. A. *et al.* Occurrence, efficacy, metabolism,  
453 and tototoxicity of triclosan. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, New  
454 York, v.28, n.3, p.147-71, Jul. 2010.
- 455
- 456 FENG, Y.; ZHANG, P.; ZHANG Z. *et al.* Endocrine disrupting effects of triclosan on  
457 placenta of pregnant rats. **PLoS One**, San Francisco, v.11, n.5, May. 2016.
- 458
- 459 GEENS, T.; DIRTU, A. C.; DIRINCK, E. *et al.* Daily intake of bisphenol A and triclosan and  
460 their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight  
461 and obese individuals. **Environ Int**, Amsterdam, v.76, p.98-105, Mar. 2015.
- 462
- 463 GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization  
464 of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B**, v.80, p. 84-  
465 97, 2007.
- 466
- 467 GUPTA, S.; GOVILA, V.; PANT, V. A. *et al.* Implication of triclosan as na anti-cytokine  
468 drug in chronic periodontitis. **Int J Adv Res**, India, v.4, n.5, p.1164-9, 2016.
- 469
- 470 HAPON, M. B.; SIMONCINI, M.; VIA, G. *et al.* Effect of hypothyroidism on hormone  
471 profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. **Reproduction**, Cambridge,  
472 v.126, p.371-382, Sep. 2003.
- 473
- 474 HAPÓN, B. M.; GAMARRA-LUQUES, C.; JAHN, G. A. Short termhypothireoidismaffects  
475 ovarian function in the cycling rat. **Reprod Biol Endocrinol**, London, v.8, n.14, Feb. 2010.
- 476
- 477 HOLEMANS, K.; GERBER, R.T.; MEURRENS, K. *et al.* Streptozotocin diabetes in the  
478 pregnant induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Diabetologia**, Berlin, v. 42, p.  
479 81-89, Jan. 1999.
- 480
- 481 HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A. K. The effect of triclosan on  
482 hormone secretion and viability of humanchoriocarcinoma JEG-3 cells. **Reprod Toxicol**,  
483 Elmsford, v.34, n.3, p.385-92, Nov. 2012.
- 484

- 485 ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M. *et al.* Effects of triclosan on the early life  
486 stages and reproduction of medaka *Oryziaslatipes* and induction of hepatic vitellogenin.  
487 **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v.67, n.2, p. 167-79, Apr. 2004.  
488
- 489 JAMES, M. O., LI, W., SUMMERLOT, D. P. *et al.* Triclosan is a potent inhibitor of estradiol  
490 and estrone sulfonation in sheep placenta. **Environ Int**, Elmsford, v.36, p.942–949, Nov.  
491 2010.  
492
- 493 JUNG, E. M.; AN, B./ S.; CHOI, K. C. *et al.* Potential estrogenic activity of triclosan in the  
494 uterus of immature rats and rat pituitary GH3 cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v.208, n.2,  
495 p.142-8, Jan. 2012.  
496
- 497 KIYOHARA, M.; SON, L. S.; TRUTRUI, K. Involvement of gonadotropin-inhibitory  
498 hormone in pubertal disorders induced by thyroid status. **Scientific reports**, London, v.7,  
499 p.1042, Abril 2017.  
500
- 501 KUMAR, V.; CHAKRABORTY, A.; KURAL, M. R. *et al.* Alteration of testicular  
502 steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan.  
503 **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.27, n.2, p.177-85, Apr. 2009.  
504
- 505 LAN, Z.; KIM, T. H.; BI, K. S. *et al.* Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the  
506 epididymis and shows sperm toxicity in male Sprague-dawleyrats. **Environ Toxicol**, New  
507 York, v.30, n.1, p.83-91, Jan. 2013  
508
- 509 LARA, R. E.; DISSEN, G.A.; LEYTON, V. *et al.* An increased intraovarian synthesis of  
510 nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced  
511 polycystic ovary in the rat. **Endocrinology**., v. 141, p. 1059-1072, 2000.  
512
- 513 MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle  
514 phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**., v.62 4A, p.609-  
515 614, 2002.  
516

- 517 NABI, N.; MUKERJEE, C.; SCHMID, R. *et al.* In vitro and in vivo studies on  
518 triclosan/PVM/MA copolymer/NaF combination as an anti-plaque agent. **Am J Dent.**, San  
519 Antonio, v.2, p.197-206, Sep. 1989.
- 520
- 521 NIEDZIELA, M. & KORMAN, E. Severe hypothyroidism due to autoimmune atrophic  
522 thyroiditis-predicted target height and a plausible mechanism for sexual precocity. **J Pediatr**  
523 **Endocrinol Metab**, v.14, p. 901-7, 2001.
- 524
- 525 PANCER, B. A.; KOTT, D.; SUGAI, J. V. *et al.* Effects of triclosan on host response and  
526 microbial biomarkers during experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.43,  
527 n.5, p.435-44, May. 2016.
- 528
- 529 PAUL, K. B.; HEDGE, J. M.; BANSAL, R. *et al.* Developmental triclosan exposure  
530 decreases maternal, fetal and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a  
531 putative mode-of-action. **Toxicology**, Amsterdam, v.300, n.1-2, p.31-45, Oct. 2012.
- 532
- 533 PAUL, K. B.; HEDGE, J. M.; DEVITO, M. J. *et al.* Short-term exposure to triclosan  
534 decreases thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in young Long–Evans rats.  
535 **Toxicol Sci**, Orlando, v.113, n.2, p. 367–379, Feb. 2009.
- 536
- 537 RODRIGUEZ, P. E. A. & SANCHEZ M. S. Maternal Exposure to Triclosan Impairs Thyroid  
538 Homeostasis and Female Pubertal Development in Wistar Rat Offspring, **Journ of Toxicol**  
539 **and Environ Health**, v.73, n.24, p.1678-1688, 2010
- 540
- 541 SHEKHAR, S.; SOOD, S.; SHOWKAT, S. *et al.* Detection of phenolic endocrine disrupting  
542 chemicals from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population.  
543 **Gen Comp Endocrinol**, New York, n.16, May. 2016.
- 544
- 545 SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional  
546 deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research.**, v.28,  
547 p. 85-95, 1971.
- 548

- 549 STOKER, T. E.; GIBSON, E. K.; ZORRILA, L. M. Triclosan exposure modulates estrogen-  
550 dependent responses in the female winstar rats. **Toxicol Sci**, Orlando, v.117, n.1, p.45-53, Sep.  
551 2010.
- 552
- 553 TATARAZAKO, N.; ISHIBASHI, H.; TESHIMA, K. *et al.* Effectos of triclosan on various  
554 aquatic organisms. **Environ Sci**, Tokyo, v.11,n.2, p.133-140, 2004.
- 555
- 556 VELDHOEN, N.; SKIRROW, R. C.; OSACHOFF, H. *et al.* The bactericidal agent triclosan  
557 modulates thyroid hormone-assicuated gene expretion and disrupts postembryonic anurun  
558 development. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 80, n.3, p.217-27, Dec.2006.
- 559
- 560 WANG, C. F, & TIAN, Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population  
561 exposure, present evidence and potential mechanisms. **Environ Pollut**, Totonto, v.206, p.195-  
562 201, Nov. 2015.
- 563
- 564 WANG, X.; CHEN, X.; FENG, X. *et al.* Triclosan causes spontaneous abortion accompanied  
565 by decline of strongen sulfotransferase activity in humans and mice. **Sci Rep**, London, v.5, p.  
566 507-13. Dec. 2015.
- 567
- 568 WEBER,G.; VIGONE, M. C.; STROPPA, L. et al. Thyroid function ant puberty. **J Pediatr**  
569 **Endocrinol Metab**, n.2, p.253-7, 2003.
- 570
- 571 WEI, L.; QIAO, P.; SHI, Y. *et al.* Triclosan/Triclocarban levels in maternal and umbilical  
572 blood samples and their association with fetal malformation. **Clinica Chimica Acta**, 466, p.  
573 133/7, 2017.
- 574
- 575 WEISS, L.; ARBUCKLE, T E.; FISHER, M. *et al.* Temporal variability and sources of  
576 triclosan exposure in pregnancy. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v.218, n.6, p.507-13, Aug.  
577 2015.
- 578
- 579 ZHU, W.; ZHANG, Z.; TONG, C. *et al.* Enviromental exposure of triclosan and semen  
580 quality. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v.13, n.2, p.224, Feb. 2016.
- 581

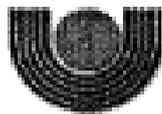
582 ZORRILLA, L. M.; GIBSON, E. K.; JEFFAY, S. C. *et al.* The Effects of Triclosan on  
583 Puberty and Thyroid Hormones in Male WistarRats. **Toxicol Sci**, Orlando, v.107, n.1, p. 56–  
584 64, Jan. 2009.

585

586

587

- 588 ANEXO 1  
589  
590 Parecer de protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

## PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Estudo dos efeitos decorrentes da exposição materna ao triclosan, durante a prenhez e lactação nos tecidos orais e função reprodutiva na prole feminina de rato Wistar", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

### ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 01/12/2016

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 2729/2014 - GRE